

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 01080294
PUBLICATION DATE : 27-03-89

APPLICATION DATE : 21-09-87
APPLICATION NUMBER : 62238394

APPLICANT : MARUBENI CORP;

INVENTOR : HIMENO MICHIO;

INT.CL. : C12N 15/00 A01N 63/00 C07K 13/00 C12N 1/20 C12P 21/02 //(C12P 21/02 , C12R 1:19)

TITLE : BT INSECTICIDAL PROTEIN GENE

ABSTRACT : PURPOSE: To mass-produce an insecticidal protein, produced by *Bacillus.thuringiensis.israeliensis* strain and capable of exhibiting high insecticidal activity against larvae of striped mosquito, by elucidating gene of the insecticidal protein and using a genetic recombination technique.

CONSTITUTION: A genetic library is prepared from a plasmid DNA of *Bacillus.thuringiensis.israeliensis* and screened by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method using anti-israeliensis insecticidal protein IgG. Thereby a plasmid containing the aimed insecticidal protein gene is isolated.

COPYRIGHT: (C)1989,JPO&Japio

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-80294

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和64年(1989)3月27日

C 12 N 15/00
A 01 N 63/00
C 07 K 13/00
C 12 N 1/20
C 12 P 21/02
// (C 12 P 21/02
C 12 R 1:19)

A-8412-4B
F-7057-4H
8318-4H
G-8515-4B
C-6712-4B

審査請求 未請求 発明の数 6 (全8頁)

⑮ 発明の名称 B T殺虫蛋白遺伝子

⑯ 特 願 昭62-238394

⑰ 出 願 昭62(1987)9月21日

⑱ 発 明 者 駒 野 徹 京都府京都市西京区大枝南福西町2丁目15-14
⑱ 発 明 者 姫 野 道 夫 東京都中野区上高田5丁目5番2-501号
⑲ 出 願 人 住友化学工業株式会社 大阪府大阪市東区北浜5丁目15番地
⑲ 出 願 人 丸 紅 株 式 会 社 大阪府大阪市東区本町3丁目3番地
⑳ 代 理 人 弁理士 諸 石 光 照 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

B T殺虫蛋白遺伝子

2. 特許請求の範囲

(1) 第2図に記載のアミノ酸配列で特定される

パチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス

株の殺虫蛋白遺伝子並びにこれを含むDNA配列

(2) 第2図に記載のアミノ酸配列で特定される

パチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス

株の殺虫蛋白遺伝子を含む組換えプラスミド

(3) 第2図に記載のアミノ酸配列で特定される

パチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス

株の殺虫蛋白遺伝子を含む組換えプラスミドを含む微生物

(4) pBGH3、若しくは pUCH3と命名した発現プラスミドを保持する特許請求の範囲第3項記載の微生物

(5) 大腸菌JM109/pUCH3 或いはHB101/pBGH3 である特許請求の範囲第3項記載の微生物

(6) 第2図に記載のアミノ酸配列を有する殺虫蛋白

(7) 第2図に記載のアミノ酸配列で特定されるパチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス株の殺虫蛋白遺伝子を含み、これを微生物で発現させる発現プラスミド

(8) pBGH3、及びpUCH3と命名した特許請求の範囲第7項記載の発現プラスミド

(9) 第2図に記載のアミノ酸配列で特定されるパチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス株の殺虫蛋白遺伝子を含む発現プラスミドにより形質転換され該殺虫蛋白を生産する微生物を培養することを特徴とする殺虫蛋白の製造方法

(10) 遺伝子が第2図に記載の塩基配列で特定されることを特徴とする特許請求の範囲第9項記載の製造方法

(11) pBGH3、若しくはpUCH3と命名した発現プラスミドを保持する微生物を培養することを特徴とする特許請求の範囲第9項記載の製造方法

3. 発明の詳細な説明

特開昭64-80294 (2)

産業上の利用分野

本発明は、ヤブカに代表される双翅目の幼虫に対して高い殺虫活性を示すバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス株の殺虫蛋白、該殺虫蛋白の遺伝子、該遺伝子を含みこれを大腸菌及び枯草菌等で発現させる発現プラスミド、該プラスミドを保持しバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシスの殺虫蛋白を生産する微生物および該微生物を培養することを特徴とする殺虫蛋白の製造方法に関する。

従来の技術

バチラス・チュリンゲンシスの各種菌株は孢子形成期に殺虫蛋白からなる1~2 μ mにおよぶ結晶を形成し、この結晶蛋白を摂食した昆虫は、摂食活動を停止し、腸管破裂等を起こしたのち、死に至ることが知られており、ある種の菌株の製剤は殺虫剤として使用されている。

バチラス・チュリンゲンシス株は、鞭毛抗原やエステラーゼ活性などにより29亜種に分類されており、各々の菌株は特異的、かつそれぞれ、異なる

化した後、同遺伝子の構造遺伝子部分の3408塩基の全配列を決定し、殺虫蛋白の全1次構造を解明した。更に、この殺虫蛋白遺伝子を大腸菌あるいは枯草菌等の発現ベクターに接続し、大腸菌等の微生物に導入することにより、殺虫蛋白を大量生産する微生物を創製し、この微生物を培養することによりバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシスの殺虫蛋白を大量生産する製造方法を完成した。本発明のバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシスの殺虫蛋白遺伝子は第2図に記載した塩基配列およびアミノ酸配列で特定される。本発明に係る殺虫蛋白は分子量124kDaで既に明らかにされているバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシスの殺虫蛋白である分子量68kDaおよび28kDaとは明らかに異なる新規の殺虫蛋白である。本発明の殺虫蛋白遺伝子を含むプラスミドはバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシスのプラスミドDNAから遺伝子ライブラリーを作成し、抗イスラエレンシス殺虫蛋白IgGを用いたエリザ法によりスクリーニングするこ

る殺虫活性を示す。バチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシスの殺虫蛋白はこの菌株のプラスミド上の遺伝子にコードされていることが、Sekarら(Gene, 33 (1985)p151-158), Waaijijkら(Nucleic Acids Research 13 (1985) p8207-8217), Wardら(Journal of Molecular Biology, 191, (1986)p1-11), Bourgouinら(Molecular General Genetics, 205, (1986)p390-397)およびHimenoら(Agricultural and Biological Chemistry, 49(1985), p573-580)などにより示されている。

またバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシスの殺虫蛋白の性質はThomasら(Journal of Cell Science, 60 (1983)p181-197)及びTyrellら(Journal of Bacteriology, 145, (1981), p1052-1062)に記載されている。

問題解決の手段

本発明者らはヤブカの幼虫に対し高い殺虫活性を示すバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス株の生産する新規な殺虫蛋白をコードする遺伝子を当該菌株の巨大プラスミドからクローン

とにより単離することができる。或いは、第2図記載の塩基配列より合成したスクレオチドをプローブとして用い、常法によりスクリーニングすることにより単離することができる。

よく知られているように多くのアミノ酸についてはそれをコードするDNA塩基配列は複数存在する。従って、その塩基配列は一義的に決まらず多数の可能性が在りうる。本発明者らにより明らかにされたバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス株の殺虫蛋白のアミノ酸配列をコードする遺伝子の場合も、そのDNAの塩基配列は、天然の遺伝子の塩基配列以外にも多数の可能性があるが、本発明の遺伝子は、天然のDNA塩基配列のみに限定されるものではなく、本発明により明らかにされた殺虫蛋白のアミノ酸配列をコードする他のDNA塩基配列を含むものである。

また、遺伝子組換え技術によれば基本となるDNAの特定の部位に、該DNAがコードするものの基本的な特性を変化させることなく、あるいはその特性を改善するように、人為的に変異を起こすこ

とができる。本発明により提供される、天然の塩基配列を有する遺伝子あるいは天然のものとは異なる塩基配列を有する遺伝子に関しても、同様に人為的に挿入、欠失、置換を行うことにより天然の遺伝子と同等あるいは改善された特性とすることが可能であり、本発明はそのような変異遺伝子を含むものである。

本発明のパチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシスの殺虫蛋白遺伝子を適当なベクター、例えば *lac* プロモーターを保持する発現ベクター *pUC18* や *pUC19* (ファルマシア社)、大腸菌の強力プロモーターである *lac* プロモーターと *rrnB* リボソーム RNA のターミネーターをもつ発現ベクター *pKK223-3* (ファルマシア社)、*lrrp* プロモーターを保持する発現ベクター *pDR720* (ファルマシア社)、誘導可能な発現ベクター *pPL-Lambda* (ファルマシア社)、枯草菌用ベクター *pC194*、*pVB110* などに接続することにより大腸菌や枯草菌等の微生物でパチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス株の殺虫蛋白を生産させる発現ベクターを構築する

蛋白或いは固体処理物は殺虫剤として有用である。

以下に実施例を挙げ本発明を更に詳細に説明する。本発明は、以下の実施例のみに限定されるものではなく、本発明の技術分野に於ける通常の変更をすることができる。

実施例

1. パチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシスの殺虫蛋白遺伝子のクローニング

ステップ1 プラスミド DNA の調製

パチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス HD522 株 (アメリカ農務省 (USDA) 寄託菌株 Goldberg ONR60) を 100 ml の PY の培地 (トリプトン (シグマ社) 10g, NaCl (半井化学) 5g, イーストエキストラクト (シグマ社) 5g を加え蒸留水で 1 l とし、pH 7.0 に調整した培地) 中で 30°C 1 晩培養し、3,500 rpm 15 分間の遠心で集菌後、Birnboim らの方法 [Nucleic Acids Res. 7:1513-1523 (1979)] に従い、プラスミド DNA を調製し、CsCl-EtBr 平衡密度勾配遠心法により精製した。さらに、調製したプラスミド DNA を 5~25% の庶

特開昭64-80294 (3)

とができる。本発明の殺虫蛋白遺伝子を保持する発現ベクターを大腸菌 JM109 株 (ファルマシア社)、や枯草菌等の宿主微生物に導入することにより殺虫蛋白を生産する微生物を得ることができる。

この様にして製造された形質転換微生物を適当な条件下 (例えば、培地: 1 l の蒸留水に対して 10g のトリプトン、5g の NaCl、5g のイーストエキストラクト、1g グルコース (pH 7.2)、培養温度: 37°C、培養時間: 8-24 時間、培養条件: 振とう培養) で培養することにより該殺虫蛋白を大量生産することが可能である。培養後の殺虫蛋白の単離は、例えば、菌体を超音波で破砕し、遠心分離することにより、殺虫蛋白からなる懸濁液を容易に濃縮、回収する操作により行うことができる。また、大腸菌や枯草菌の宿主ベクター系のみならず、酵母、シュドモナス菌あるいは放線菌の宿主ベクター系も利用可能であり、それぞれの宿主ベクター系の特徴を生かした殺虫蛋白の大量生産が行える。このようにして得られた殺虫

糖濃度勾配中で 31,000 rpm で 2.5 時間遠心することによりサイズ分画を行い、巨大プラスミド画分を分取した。0.5% アガロース電気泳動の結果、この画分に含まれるプラスミドの分子量は少なくとも 63 Md 以上であった。

ステップ2 遺伝子バンクの作製

調製した巨大プラスミド DNA 約 1 μ g に 10 ユニットの制限酵素 *Hind* III (宝酒造) を加え、20 μ l の *Hind* III 反応液 (10 mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl) 中で 37°C 2 時間反応させた。ついで、等容の TE 緩衝液飽和フェノール (TE は 10 mM Tris-塩酸 (pH 8.0) - 1 mM EDTA) を加え、フェノール抽出を行い、12,000 rpm / 5 分遠心し、上層画分を分取した。さらに等容の水飽和ジエチルエーテルによる処理を 2 回繰り返し、2 容の冷エタノールおよび最終濃度 0.3 M CH₃COONa (pH 7.0) となるよう 3 M CH₃COONa (pH 7.0) を添加し、-20°C で 30 分間放置した。12,000 rpm、5 分間の遠心により沈澱を集め、さらに 70% エタノールで洗浄した後沈澱を乾固し、5 μ l の TE に懸濁し

特開昭64-80294 (4)

た。

なお、以下に実施するエタノール沈澱はすべてこの方法に従った。つぎに、Birnboim と Doly の方法 (Nucleic Acids Res. 7 (1979) 1513 - 1523) により大腸菌 HB101/pBR322 より調製した後 CaCl₂-EtBr 平衡密度勾配遠心法により精製した 1 μ g の大腸菌クロニングベクター pBR322 に対し、10 ユニットの制限酵素 Hind III を加え、同様に、20 μ l の Hind III 反応液中で 37℃ 5 時間反応し、フェノール抽出、ジエチルエーテル処理、ついでエタノール沈澱による DNA 回収を行い、10 μ l の TE に懸濁した。10 μ l の Hind III 切断 pBR322 に、10 μ l の牛牛小腸アルカリホスファターゼ (4 ユニット相当、Boehringer) を加え、最終容量 20 μ l のアルカリホスファターゼ反応液 (50mM トリス-塩酸緩衝液 pH9.0、1mM MgCl₂、0.1mM ZnCl₂、1mM スペルミジン) 中で 37℃ 1 時間反応後、フェノール抽出を 2 回行ったあと、エタノール沈澱により DNA を回収し、20 μ l の TE に懸濁した。このようにして調製したイスラエレンシス株のプラス

ミド由来の Hind III DNA 切断 5 μ l とアルカリホスファターゼ処理した、pBR322 Hind III DNA 断片 2 μ l を混合後、1 μ l の T4DNA リガーゼ (宝酒造、10 ユニット) を加え、最終容量 20 μ l の T4DNA リガーゼ反応液 (66mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5)、6.6mM MgCl₂、10mM DTT、1mM ATP) 中で、16℃ で 12 時間インキュベートした。反応後、リガーゼ反応液 20 μ l に対し、コーエンらの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, (1972) 2110-2114) により調製した 200 μ l のカルシウム処理大腸菌 HB101 を加え、0℃ に 30 分間放置した後、42℃ で 60 秒間熱処理した。ついで、2 倍濃度の L 培地を 0.3 μ l 加え、37℃ で 1.5 時間インキュベートした。インキュベート後、0.1 μ l を最終濃度 50 μ g/ml のアンピシリンを含む L 平板培地 (L 培地に 1.2% の寒天を加え、固化した平板培地) にプレートし 37℃ で 1 夜培養した。

ステップ 3 エリザ法によるスクリーニング

生じたアンピシリン耐性コロニーのうちテトラサイクリン感受性コロニーを含むプレートをクロ

ロホルム処理した後、コロニーをバイオダイン A フィルター (日本ボール社) に移し Henning らの方法 (Analytical Biochemistry, 97, p153-157 (1979)) に従い、コロニーの固定及びブロッキングを行った。但しブロッキングに際しては、正常ウサギ血清のかわりに牛血清アルブミン (シグマ社) を用いた。つぎに、イスラエレンシス 4Q1 株 (オハイオ州立大 バチラス・ジェネティック、ストックセンター寄託株 Goidberg ONR60A) より得られる全結晶蛋白の可溶画分を抗原としウサギに注射した後、血清から抗イスラエレンシス結晶蛋白 IgG を調製した。マレイミド法 (J. Applied Biochemistry, 4 p41-57 (1982)) により該 IgG とパーオキシダーゼを結合させた。0.5% BSA および 50 μ g/ml のパーオキシダーゼ結合 IgG を含む PBS 緩衝液 (0.125M NaCl、0.02M リン酸二カリウム (pH7.2)) に処理フィルターを 4℃ 終夜浸したあと PBS 緩衝液にて洗浄、風乾し、フィルターを 0.5 μ g/ml の 3,3'-ジアミノベンチジンおよび 0.05% H₂O₂ を含む PBS 緩衝液に浸し、発色させる

ことにより、陽性コロニーのスクリーニングを行った。約 1,000 のアンピシリン耐性テトラサイクリン感受性のコロニーをスクリーニングした結果、陽性クローン HB101/pBGH3 が単離された。制限酵素地図を作製したところ、pBGH3 は 7.7Kb の Hind III 断片を保持していた。

2. 発現プラスミド pUCH3 の構築

ステップ 1 5.2 Kb の Hind III 断片の調製

単離した陽性クローン HB101/pBGH3 から Birnboim と Doly の方法に従い、プラスミド DNA を調製し、CaCl₂-EtBr 平衡密度勾配遠心法により精製した。約 10 μ g のプラスミド pBGH3 DNA に対し、10 ユニットの制限酵素 Hind III を加え、50 μ l の Hind III 反応液中で 37℃ 1 時間反応させた。反応液を 1 μ g/ml の臭化エチジウムを含む 0.7% アガロースゲル (Agarose Type VI、シグマ社) に供し、アガロース電気泳動を行った。泳動後、紫外線ランプ下で 5.2Kb の Hind III DNA 断片に相当する部分を切出し、電気溶出法によりバンドを回収し、TE に懸濁したのち、TE 酸和フェノールを加えてフェノール

抽出を行った。12,000rpm で5分間遠心し、上層を分取した後、エタノール沈澱にて回収したDNAを20 μ lのTEに懸濁した。

ステップ2 大腸菌発現プラスミドpUCH3の構築

BirnboimとDolyの方法に従い、大腸菌発現ベクター pUC13 DNAを調製し、CsCl-EtBr 平衡密度勾配遠心法により精製した。約1 μ gのプラスミドpUC13DNAに対し、10ユニットの制限酵素HindⅢを加え、20 μ lのHindⅢ反応液中で37℃ 5時間反応した後、フェノール抽出、エーテル抽出、エタノール沈澱を行い、DNAを回収し、10 μ lのTEに懸濁した。このDNA溶液を仔牛小腸アルカリホスファターゼ(4ユニット、Boehringer)、20 μ lのアルカリホスファターゼ反応液中で37℃ 1時間反応し、アルカリホスファターゼ処理を行った。反応後、フェノールクロロホルム処理を2回行ったのち、上澄を分取し、エタノール沈澱によりDNAを回収し20 μ lのTEに懸濁した。つぎにステップ1で調製したHindⅢ断片5 μ lとアルカリホスファターゼ処理したHindⅢ切断pUC13 2 μ lを混合

ピシリン、1mMのIPTG(イソプロピル- β -D-ガラクトシド)を含む200 μ lのLBプロス培地(1lの蒸留水に10gのトリプトン(シグマ社)、5gのイーストエキストラクト、5gのNaClおよび1gのグルコースを含む、pH7.2の培地)中で28℃終夜培養し、遠心後10 μ lの0.1M 2-メルカプトエタノール液に懸濁後、5~10分超音波破碎した。該溶液に10 μ lの0.2M グリシン-NaOH(pH10.5)を加え、37℃ 3時間インキュベートすることによりアルカリ溶解を行った。つぎに、1N塩酸にてpH7.5にせしめ、遠心した後、上澄を分取し、50%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、氷中に1時間置いた後、遠心操作により、湿重約1.6gの蛋白沈澱を得た。沈澱を0.05M 2-メルカプトエタノール-0.1M グリシン-NaOH(pH10.5)の溶液4 μ lに懸濁後、136 mM NaCl、2.7 mM KCl、81 mM Na₂HPO₄、1.5 mM KH₂PO₄の緩衝液に対して透析を行い、遠心上澄を分取し、固相抽出液とした。200 μ gの蛋白を12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Laemmliの方法、Na

特開昭64-80294(5)

し、1 μ lのT4DNAリガーゼ(宝酒造、10ユニット)を加え、最終容量20 μ lのT4DNAリガーゼ反応液(66mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)、6.6mM MgCl₂、10mM DTT、1mM ATP)中で16℃で12時間インキュベートした。得られたリガーゼ反応液20 μ lをハナハンらの方法(Hanahan, D. J. Mol. Biol., 166(1983)557-580)で調製した100 μ lの大腸菌JM109株のコンピーテントセルに加え、0℃で30分間インキュベートし、42℃で90秒間熱処理したのち、0.8 μ lのLBプロス液体培地を加え、37℃ 1.5時間インキュベートし、最終濃度50 μ g/mlのアンピシリン、X-gal 0.004%, 0.1mM IPTGを含むLB平板培地にプレートした。得られたアンピシリン耐性白色コロニーよりプラスミドDNAをBirnboimとDolyの方法で調製し、制限酵素HindⅢで切断後、ベクターのpUC13以外に5.2KbのHindⅢ断片を保持するクローンを単離し、pUCH3と名付けた。

3. 殺虫蛋白遺伝子の大腸菌での発現

大腸菌組換え体 JM109/pUCH3株を50 μ g/mlアン-

ピシリン、1mMのIPTG(イソプロピル- β -D-ガラクトシド)を含む200 μ lのLBプロス培地(1lの蒸留水に10gのトリプトン(シグマ社)、5gのイーストエキストラクト、5gのNaClおよび1gのグルコースを含む、pH7.2の培地)中で28℃終夜培養し、遠心後10 μ lの0.1M 2-メルカプトエタノール液に懸濁後、5~10分超音波破碎した。該溶液に10 μ lの0.2M グリシン-NaOH(pH10.5)を加え、37℃ 3時間インキュベートすることによりアルカリ溶解を行った。つぎに、1N塩酸にてpH7.5にせしめ、遠心した後、上澄を分取し、50%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、氷中に1時間置いた後、遠心操作により、湿重約1.6gの蛋白沈澱を得た。沈澱を0.05M 2-メルカプトエタノール-0.1M グリシン-NaOH(pH10.5)の溶液4 μ lに懸濁後、136 mM NaCl、2.7 mM KCl、81 mM Na₂HPO₄、1.5 mM KH₂PO₄の緩衝液に対して透析を行い、遠心上澄を分取し、固相抽出液とした。200 μ gの蛋白を12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Laemmliの方法、Na

各蛋白濃度の固相蛋白を含む1 μ lの0.1M トリス-塩酸(pH7.4)に対して、10 μ lの1%ラテックスビーズ(シグマ社 0.8 μ m)を混合した後、室温に1時間放置し、蛋白をビーズに吸着させた。該溶液を3令のCulex pipiens 幼虫20頭入りの24 μ l蒸留水に加え、殺虫活性を測定した。その結果、コントロールに用いたJM109/pUCH3株の固相蛋白液240 μ g/mlでは、24時間後および48時間後でも死虫は観察されなかったが、JM109/pUCH3株では30 μ g/ml前後で死虫が観察された。LC₅₀値を測定したところ、24時間後で39 μ g/ml、

特開昭64-80294 (6)

48時間後で32 μ g/mlであった。以上のことから JM109/pUCH3株では *C. pipiens* に殺虫活性を有する135 ~145 KDa 蛋白が生産されていることが明らかとなった。

4. イスラエレンシス殺虫蛋白遺伝子の塩基配列の決定

イスラエレンシス 135~145 KDa 殺虫蛋白遺伝子の構造を確認するため、プラスミド p8GH3及び pUCH3より各種、制限酵素断片を調製し、クローニングベクター M13mpl8および M13mpl9に再クローニングした。pUCH3および各種 M13サブクローンについてはY.PerronらのエキソスクレーパーⅢおよびⅥによる欠失法(Y.Perron et.al.Gene.33(1985)103-119)で各種欠失クローンを得たのち、M13シーケンシングキット(宝酒造)に従い塩基配列の決定を行った。即ち、得られたサブクローンプラスミドDNAを18 μ lのTE(pH8.0)に懸濁後、2 μ lの2N NaOHを加え、室温で5分間放置し、8 μ lの5.0M酢酸アンモニウムを加え、100 μ lの冷エタノールを加え、エタノール沈澱を行った。

行った。ゲルを乾燥後、X線フィルムにはさみ感光後、塩基配列を読みとった。決定した塩基配列を第2図に示す。本発明のパチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス H0522株の殺虫蛋白遺伝子の構造遺伝子部分は第2図の塩基配列の第461番目から第463番目の塩基ATG(開始コドン)から始まり、ストップコドンTGAで終わる3408塩基のコーディング領域をもち、1136個のアミノ酸をコードしていた。その結果、コードされる殺虫蛋白の分子量は124KDaと推定される。

4. 図面の簡単な説明

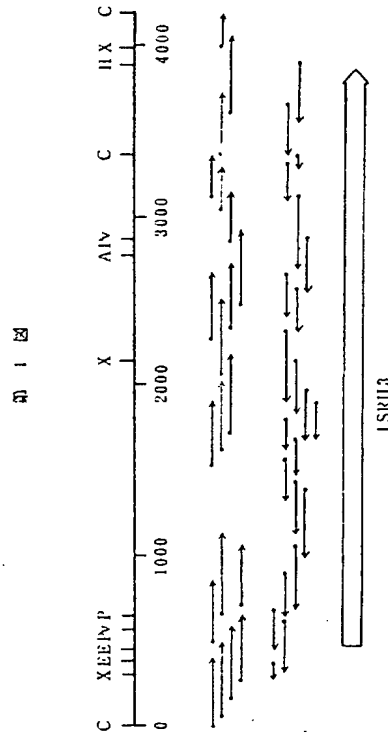
第1図はパチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス H0522株の124KDa殺虫蛋白遺伝子の制限酵素地図を示す。白い矢印は、殺虫蛋白遺伝子のコーディング領域を示す。黒い矢印は塩基配列決定の際のダイデオキシ法のストラテジーを示している。

Cは ClaI, Xは XbaI, Eは EcoRI, P_vは PvuII, Pは PstI, Hは HindIII、ISRH3はイスラエレンシス 124KDa 殺虫蛋白遺伝子を各々示す。

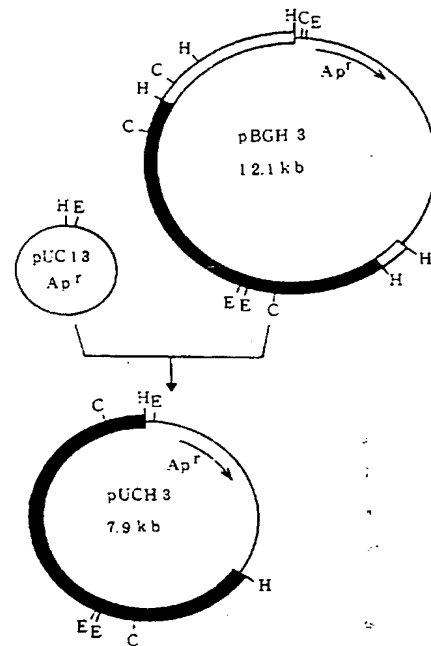
12,000 rpmで5分間遠心し、沈澱を回収後、70%エタノールで洗浄し、乾固し、0.5 pmole/5 μ l以上となるよう蒸留水に溶解させた。5 μ lの調製したアルカリ変性プラスミドDNAまたはファージ本鎖DNA(5 pmol以上)に1.5 μ lの10倍濃縮クレノー緩衝液(宝酒造)、1 μ lのプライマーDNA(宝酒造)、4.5 μ lの蒸留水を加え、全容を12 μ lとし、60℃15分間加温後、室温に20分間放置した。この反応液に2 μ lの[α -³²P]dCTP(400Ci/mmol, アマシャム ジャパン(Amarsham, Japan))と1 μ lのクレノー断片酵素(宝酒造、2ユニット)を加え、混合した。この混合液の3.5 μ lずつを4種類の2 μ lのdNTP-ddNTP混合液(宝酒造)に加え、39℃で15分間放置し、さらに1 μ lの1mM dNTPを追加し15分間、39℃で放置した。最後に6 μ lの95%ホルムアミド色素(0.1%ブロムフェノールブルーと0.1%のキシレンシアノールを含む)を加えた。常法に従い6%アクリルアミド-尿素ゲルを作製し、上記反応液2~4 μ lをアプライし、3,000Vで7~24時間電気泳動を

第2図は本発明のパチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス H0522株の殺虫蛋白の遺伝子の全塩基配列を示す。殺虫蛋白遺伝子の構造遺伝子部分は塩基配列の第461番目から第463番目の塩基ATG(開始コドン)から始まり、ストップコドンTGAで終わる3408塩基のコーディング領域をもち、1136個のアミノ酸をコードしている。上段は塩基配列を下段はそれから推定されるアミノ酸配列を示す。

第3図は発現プラスミドpUCH3の構築方法を示している。黒色のボックスが殺虫蛋白遺伝子を含む5.2 KbのHindIII断片を示し、白色ボックスは殺虫蛋白遺伝子に隣接する未知のクローニングDNA断片を示す。実線部分はベクターを示している。Ap^rはアンピシリン耐性遺伝子を示す。



第 3 题



第2圖 (その1)

5' CGATTGGAATTTTCTGAATATCGAACATATATTATTTTGGATGCTTGATAACCACTAACGATATGTATGGAAAAATTATTTTGAGTGAAAAAATATGGTCAAATAAAAAATGGAATAATT

130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
ATATTGGTCAGAAATATGATTGGGATTAGTGACTCTATAATATAGAAAGGAATGTTTGTTTTTGTATATAAGTTGAAAAAGATTCTCTGTAATTTGTCGACGACCTGTATGTGTAGAT

250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
TGAGATTGGAACATATCGTTAAATTTTATATTTTAAATATAATGATATGAATTATACAAGGCTAGATAGAATTTGTCATACGAATCCGTATCAATTTTTTCAAGGAATATGTTATTTGCA

370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
CTTTTGGTCTTTTTAAATCGTATGAATTCAAAAATAGTTTATATCAATCTTTGTTACACCAGAAAAAGATTGTATCCAATGTGAATATGGGAGGAATAAATATGAATTCAGGCTATCCGTT
N N S G Y P L

490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
ACGGAATGACTTACAGGGTCAATGAAAAACACGAACATATAAAGATTGGCTAGCCATGTGTGAAAAAACCAACGATTTGGCGTTAATCCAGCTGGCATTAATCTCTTCAGTTAGTAC
A N D L Q G S Y N K N T N Y K D W L L A N C E N N Q Q Y G V N P A A I N S S S V S T

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720
CGCTTTAAAGTAGCTGGAGGCTATCCTTAAATTTGTAAGAACCCACCTGACGGTACTGCTTAAACCGTACTAGCCGGTGCTTCTCTATCTTTGGCCGCACTAATACGCAACGCCCTGAAAG
A L K V A G A I L K F V N P P A G G T V L T V L S A V G L P I L W P T N T P T P E R

730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840
AGTTTGGATGATTTTCATGACCAATACAGGAAATCTTATTTGATCAAACGTGAACAGCTTATGTACGAACAGATGCAAAATGCAAAATGACGGTTGTGAAAGATTTATTTAGATCAATATAC
V W N D F N T N T G N L I D Q T V T A Y V R T D A N A K M T V Y V K D D Y L D Q Y T

850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960
AACTAAATTTAACACTTGGAAAAGAGAGCCCTAATAACCAAGCTCTATAGAACAGCAGTAATAACTCAATTTAACTTAACCAAGTGCACAACTTCGAGAGACCGCAGTTTATTTAGCAACT
T K F N T W K R E P N N Q S Y R T A V I T G F N L T S A K L R E T A V Y F S N L

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
ACTAGTTTATGAATTTGTTTATACCAATATCCGCACAGTAGCAAAATTTCAATTTACTTTTAAATAGAGATGGCCTCATAAATGCGACACAGAATGGTCTTTAGCATGTGCGTGGTACCA
V G Y E L L L L L P I Y A Q V A N F N L L L I R D G L L I N A Q E W S L A C A G D Q Q

1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
ACTATATACCAACTATGGTGAGTACATAAGAATATATGCACATAGCAATTACAGTTATATAAAGAGTTTATAGTACTTACCTTAAAGAAATTAATCTAATGGCAATGAGTTACGTTTAATGA
L Y N T N V Q Y T K R Y I A H S I T W Y N K G I D V L R N K S N G Q W I T F N D

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320
TTATAAAGAGAGATGACTATTCAAGTATAGATATACCTGCTCTTTTGGCAGTTATGATCCACGCTGATTACCTGCGGACAAAATAGATAATACGAAACTATCAAAACAGAAATTTAC
Y K R E M T I Q V L D I L A L F A S Y D P R R L P A D X I D N T K L S K T E F T

1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
AAGAGAGATTTATACAGGTTTATGACAAATCTCCTTCTAGTAAATCTATAGCAGCACTGGAGGAGCACTTACACGAGATGTTTCATTTTACTTGGCTAAACAGAGATATTTCTGGAC
R E I Y T A L V E S P S S K S I A A I E A A L T R D V H L F T W I L K R V Y F W T

第2図 (その2)

1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560
CAATACTATATATCAAGATTTAAGATTTTATCTGCCAATAAAATGGGTTTTCATATACAAATTTCTTCAATGCAAGAAAGTGAATTTATGGAAGTTCTGGTTTGGTTCAAAATCT
N T I Y Q D L R F L S A N K I G F S Y T N S S A M Q E S G I Y G S S G F G S N L

1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
TACTCATCAAAATCAACTTAATTTCTAATGTTTATAAAATTTCTATCAGATAGTCTCCCTCTAATCGAGTTACAAAATGGATTCTACAAAATGATGGTACTCTTGGCTCTTA
T H Q I Q L N S N V Y K T S I T D T S S P S N R V T K M D F Y K I D G T L A S Y

1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
TAATTCAAATATAACCAACTCCTGAAGGTTTAAGGACCATTTTTGGATTTTCAACAAATGAGAACACACCTAATCAACCAACTGTAATGATTATACGCATATTTAAGCTATAT
N S N I T P T P E G L R T T F F G F S T N E N T P N Q P T V N D Y T H I L S Y I

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920
AAAACTGATGTTATAGATTATAACAGTAACAGGGTTTCATTTGCTTGGACACATAAGATTGTTGACCTTAATCAATACACAGATGCTATCACACAGTTCCGGCCGTAAATTC
K T D V I D Y N S N R V S F A W T H K I V D P N N Q I Y T D A I T Q V P A V K S

1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040
TAATCTCTTGAATGCAACAGCTAAAGTAATCAAGGGACCTGGTCATACAGGGGGGATCTAGTTGCTCTTACAAGCAATGGTACTCTACAGGCAGATGGAGATTCAATGTAACAAAG
V F L N A T A K V I K G P G H T G G D L V A L T S N G T L S G R N E I Q C K T S

2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160
TATTTTAAATGATCTACAAGAAGTACGGATTACGCATCGTTATGCTGCAATAGTCCAATGTTGAATGATCATATGATTACAGGAGTTTCTAGAGGAGCAACGATTAGTAC
I F N D P T R S Y G L R I R Y A A N S P I V L N V S Y V L Q G V S R G T T I S T

2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280
AGAATCTACGTTTCAAGACCTAATAATAATACCTACAGATTTAAATATCAAGAGTTTAGATACAGAAATGCTTTTATGCAATGATACCGATGAGATTATCTTCTAATCAACTGAT
E S T F S R P N N I I P T D L K Y E E F R Y K D P F D A I V P M R L S S N Q L I

2290 2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
AACTATAGCTATTCAACGCTTAAACATGACTTCAAAATAAAGTATTATTGACAGAAATGCTTCAATCACTCAATCTGATGAGACAGAGAACCAAAATTTAGAATC
T I A I Q P L N M T S N N Q V I I D R I E I I P I T Q S V L D E T E N Q N L E S

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520
AGAACGAGAGTTGTGAATGCACTGTTTACAATGACGCGAAGATGCAATTAACATTTGGAACGACAGATTATGACATAGATCAAGCCGCAAAATCTTGTGGAATGATTCTGAAGAATT
E R E V V N A L F T N D A K D A L N I G T T D Y D I D Q A A N L V E C I S E E L

2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640
ATATCCAAAGAAAAATGCTGTTATTAGATGAAGTTAAATATGCGAAACAACTTAGTCAATCTCGAAATGTAATCTCAAAACGGGGATTGTAATCGGCTACGCTTGGTGGACAAAG
Y P K E X N L L L D E V K N A K Q L S Q S R N V L Q N G D F E S A T L G W T T S

2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730 2740 2750 2760
TGATAATATCACAATCAAGAAGATGATCCTATTTTAAAGGGGATTACCTTCATATGCTGCGGCGAGAGACATTGATGATACGATATTCGACCTATATATCCCAAAATTTGATGA
D N I T I Q E D D P I F K G H Y L H V S G A R D I D G T I F P T Y I F Q K I D E

第2図 (その3)

2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880
ATCAAAATTAACCGTATACAGCTTACCTAGTAAGGGGATTTGAGGAAGTAGTAAGATGTAAGAACTAGTGGTTTCCAGCTATGGGGAAGAAATGATGCCATGCAATGTTCCAGC
S K L K P Y L V R G F V G S S K D V E L V V S R Y G E E I D A I M N V P A

2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
TGATTAAACTATCTGTCTCCTTACCTTTGATTGTGAAGGGTCTAATCGTTGTGAGAGCTCCGCTGTCCCGCTAACATTGGGAACACTTCTGATGTTGTTATTCGCAATATGA
D L N Y L Y P S T F D C E G S N R C E T S A Y P A N I G N T S D N Y S C Q Y D

3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120
TACAGGCAAAAGCATGTGCTATGTCAGGATTCCCATCAATTTAGTTTCACTATTGATACAGGGGCTATGATACAAATGAAATATAGGGGTTGGGTCATGTTTAAATATCTTCTCC
T G K K H V V C Q D S H Q F S F T I D T G A L D T N E N I G V W V N F K I S S P

3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240
AGATGGATACGCATATTAGATAATTTAGAAGTAATTGAAGAAGGGCAATAGATGGGGAAGCACTGTCCGCTGAAACACATGGAGAAGAAATGGGAACGTAATGGAAGCAAAAGC
D G Y A S L D V L E V I E E G P I D G E A L S R V K H N E K K W N D Q M E A K R

3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360
TTCGGAAACACAAAGCATATGATGAGCGAAACAGCCATTGATGCTTTATTCACAAATGTACAGATGAGGCTTTACAGTTTGTATACGACACTCGCTCAAATTCAGTACGCTGAATA
S E T Q Q A Y D V A K Q A I D A L F T N V Q D E A L Q F D T T L A Q I Q Y A E Y

3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480
TTTGGTACAATCGATTCCATATGTTGATCAATGATTGTTGTCAGATGTTCCAGGTATGAATTTATGATATCTATGATAGTTGGATGCAAGTGGCACAAGCGGCTTTTGTATGATAC
L V Q S I P Y V Y N D V L S D V P G M N Y D I Y V E L D A R V A Q A R Y L Y D T

3490 3500 3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600
AAGAAATATTAAAAATCGGTATTACACAAGGGGATGCGGCTGATGTAATGGAATGCAAGCTACAAACAAATAGATGGTGTCTGATTGTTCTATCTAATTTGAAGTGC
R N I I K N Q D F T Q G V N G W H Y T G N A D V V Q L I D G V L V L S N W S A

3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700 3710 3720
TGGCGTATCTCAAAATGCTCTCCCAACATAATCATGGGTATGCTTACGTTGTTATGCGGAAAGGACCTGGAAATGGGTATGTCAGCTTATGATGTCGAGAGAATCAAGA
G V S Q N V H L Q H N H G Y V L R V I A K R E G P G N G Y V T L N D C E E N Q E

3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800 3810 3820 3830 3840
AAATTTGACGTTTACGTTCTGTGAAGAAGCATATATTACGAAGACAGATGATGTTTCCAGATACAGATCGTGTACGAATTGAGATAGCGCAACCAAGGTTTCTTTATATCGAAG
K L T F T S C E E G Y I T K T Y D V F P D T D R V R I E I G E T E S S F Y I E S

3850 3860 3870 3880 3890 3900 3910 3920 3930 3940 3950 3960
CATTGAATTAATTTGATGACGAGCGATTAAATAAAAAATACTAAAGCTTTAAAAACCATGGAGAAAGTTTCTCATGTTTATTTCTGCAATTTAATTTCTGGTACAAAAAT
I E L I C N E *

3970 3980 3990 4000 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080
ATATAGAAAACATAAAAAATAGATATCTAGAGGACATAAAATTTATACAAATATCAATTTTATTAGTATAGAACGTTTATCCAATAAATAATTACCATTTTAACTATCCAACTACAA

4090 4100 4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180
TTGTGATCCAAGTTATGATGATTATAGATGAATGATTAGGATTTGAAAAATAGATTTTTCATCAAAACAAATGAGGGAAGAAATGCGAGGAAATCAACATCG 3'